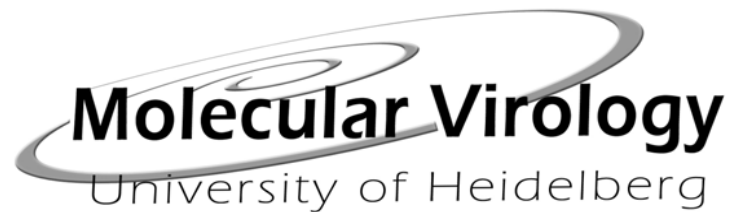


GV III, WS11/12

Teil Virologie



Prof. Ralf Bartenschlager

Department Infektiologie, Molekulare Virologie,
Med. Fakultät Heidelberg

www.klinikum.uni-heidelberg.de/Molecular-Virology

R.B.	Mi 18.1.12	Virologie	Geschichte der Virologie, Virusaufbau, Klassifizierung, Nachweis von Viren
R.B.	Do 19.1.12		Virale Replikationsstrategien
R.B.	Fr 20.1.12		Verlaufsformen von Virusinfektionen
R.B.	Mo 23.1.12		Pathogenese viraler Infektionen
R.B.	Di 24.1.12		Antivirale Therapie und Impfung

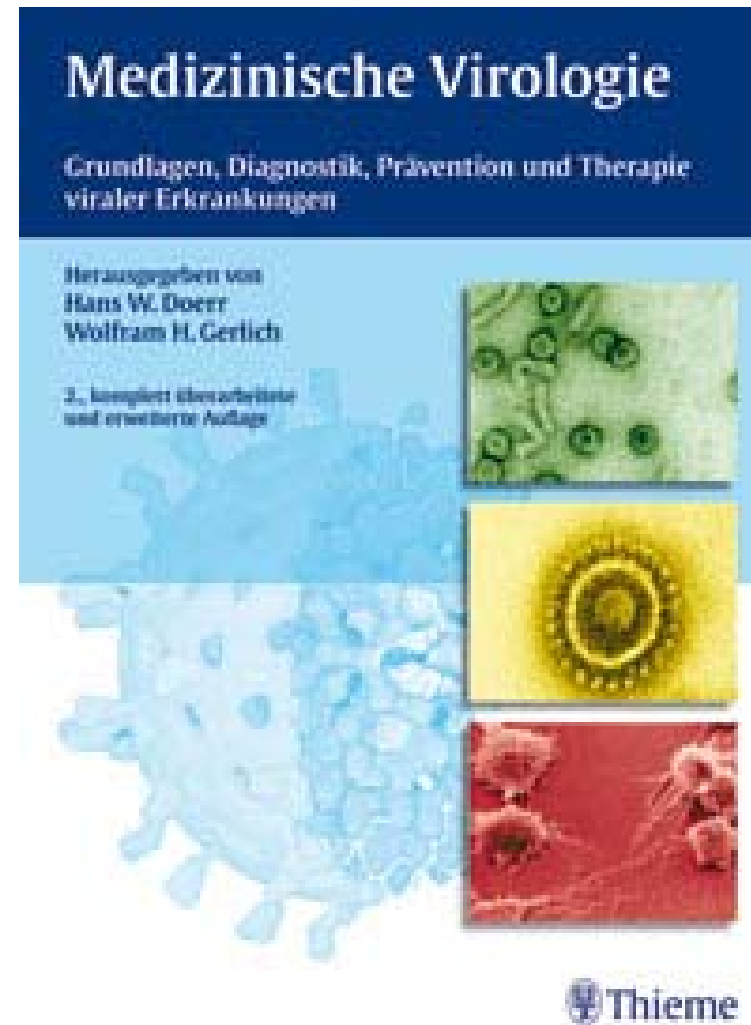
Literaturquellen

- Immunologie, Hygiene, Infektiologie, Bakteriologie, Mykologie, Virologie, Parasitologie. Kayser, Böttger, Zinkernagel u. a. Thieme Verlag, 12. Auflage



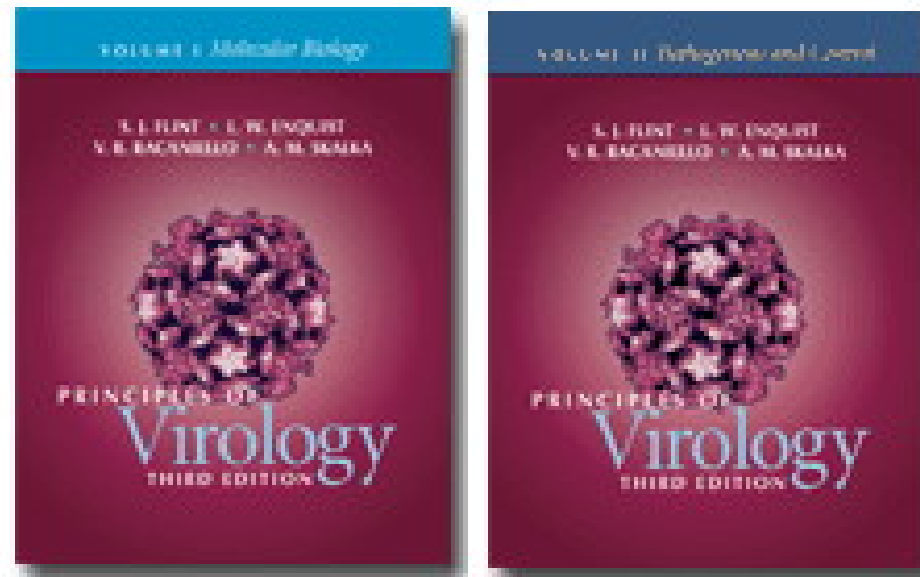
Literaturquellen

- Doerr, Gerlich. 2010.
Medizinische Virologie.
Thieme Verlag



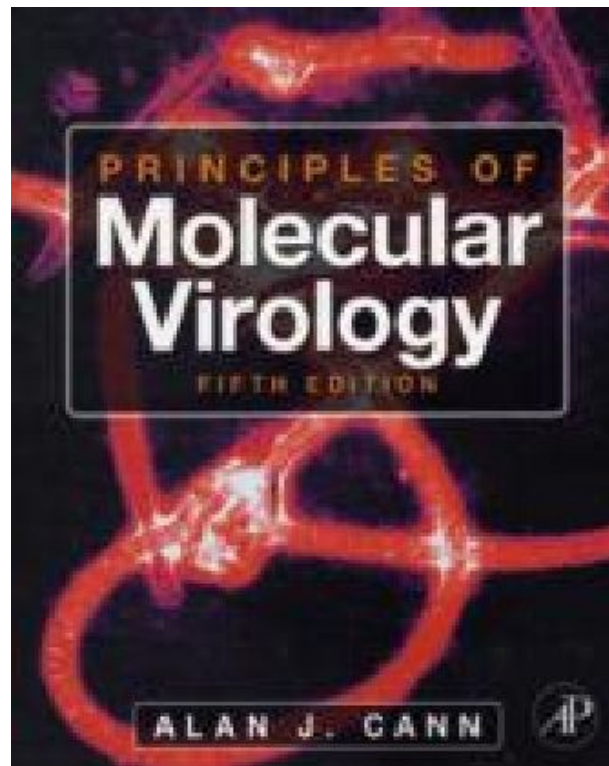
Literaturquellen

- **Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis And Control of Animal Viruses.** Flint, Enquist, Racaniello, Skalka. 3rd edition, ASM Press, ISBN 1-5581-259-7



Literaturquellen

Principles of Virology Alan J. Cann, Academic Press, ISBN 978-0-12-384939-7



Geschichte der Virologie (1)

Frühe Geschichte der Virologie = Geschichte der (Pockenschutz)Impfung

- 11. Jahrhundert: Impfversuche in China
- 1721 Lady Montague: Variolation in England
- 1796 Edward Jenner: Erste Impfung
(Kuhpocken); **Vakzine = Impfstoff**
- 1885 Louis Pasteur: Attenuation des Erregers der Tollwut

Geschichte der Virologie (2)

Entdeckung von Viren:

- **1882 Adolf Mayer: Übertragung der Tabak-Mosaik-Krankheit durch Pflanzensaft; Erreger war nicht isolierbar**



Photo by J. P. Krausz, from "Lessons in Plant Pathology," The American Phytopathological Society Education Center (<http://www.apsnet.org/education/lessonsPlantPath/TMV/text/symptom.htm>), reprinted with permission.

Geschichte der Virologie (3)

- **1892 Dimitri Ivanofsky: Erreger der Tabak-Mosaik-Krankheit ist ,nicht filtrierbar‘ und ,nicht züchtbar‘**
- **1898 Martinus Beijerinck: Erreger der Tabak-Mosaik-Krankheit vermehrt sich in lebendem Gewebe**

**Erreger ist: ultrafiltrierbar
 nicht züchtbar ausserhalb lebendem Gewebe
 ultravisibel**

,Contagium vivum fluidum‘; später Virus (lat. Gift)

Geschichte der Virologie (4)

- **1898: Löffler und Frosch; Maul- und Klauen-Seuche-Virus (1. animales Virus)**
- **1901: Walter Reed; Gelbfieber-Virus (1. Virus des Menschen)**
- **1911: Erstentdeckung einer Tumorstoffe (Rous Sarcoma Virus)**
- **1915: Entdeckung von Bakteriophagen (Twort; d'Herelle)**
- **1935: Kristallisation von TMV (Stanley)**
- **1949: Anzucht von Poliovirus (Enders, Weller, Robbins)**
- **1970: Entdeckung der reversen Transkriptase (Baltimore, Temin)**
- **1977: Letzter Pockenfall (Somalia)**
- **1983: Entdeckung von HIV**

Definition Virus

Was sind Viren?

- Filtrierbare Infektionserreger
 - (Un)sichtbar im Lichtmikroskop
 - Vermehrung nur in einer lebenden Zelle
-
- **Obligat intrazelluläre Parasiten ohne eigenen Stoffwechsel**
 - **nur eine Art von Nukleinsäure (im Partikel)**

Abgrenzung Viren - Bakterien

	Konv. Bakterien	Rickettsien	Chlamydien	Viren
Obligat. Intrazell.	-	+	+	+
Nukleinsäure	DNA und RNA	DNA und RNA	DNA und RNA	DNA oder RNA
Proteinsynthese	+	+	+	-
Energiegewinnung	+	+	-	-
Vermehrung	Zweiteilung	Zweiteilung	Zweiteilung	Montage
Antibiotikasens.	+	+	+	-

„Randgebiete“ der Virologie



	Viroid	Satellit	Prionen
Genom	zirkuläre RNA	einzelstr. RNA	-
Grösse	200 - 400	500 – 2000	-
Vorkommen	Pfl.	Pfl., Mensch	Mensch, Tier
Gen	-	1 - 2	zellulär
Replikation	RNA Pol II (Ribozym/ Wirts-RNase)	Helfervirus	Proteinfaltung
Beispiel	Coconut Cadang Cadang	Hepatitis D Virus	BSE

Grundlagen der Virologie



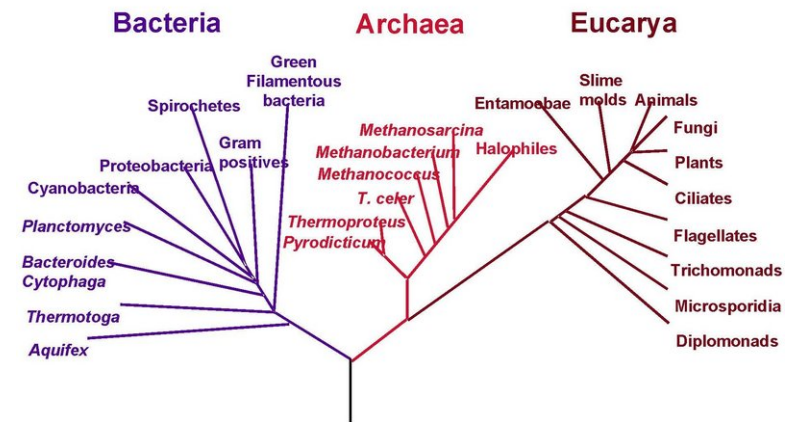
Viruses are bad news, wrapped in protein.

Sir Peter Medawar

Viren sind so alt wie ihre Wirte



Jede Spezies hat seine eigenen Viren



Viren: Die häufigste ‚Lebensform‘ im Meereswasser

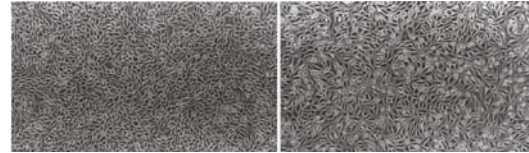


Metagenomstudien: Virusgene bilden den Großteil der Genosphäre

Gesamtmenge an Viren im Meereswasser: ~200 Mio. Tonnen Biomasse

Was ist ein Virus?

Poliovirus ist....



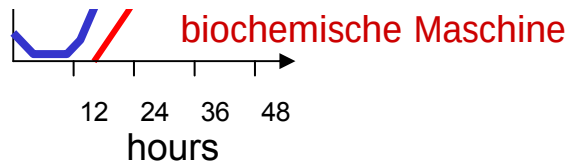
ausgerottet?
Profiteur
1 Krieg

....ein **Viren stellen den Übergang von der belebten zur unbelebten Natur dar**

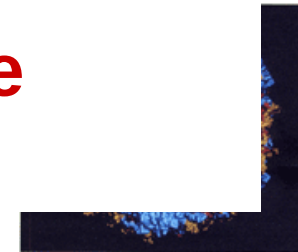
Virales Leben = infizierte Zelle



...ein selbstsüchtiges Genom



....eine faszinierende Struktur

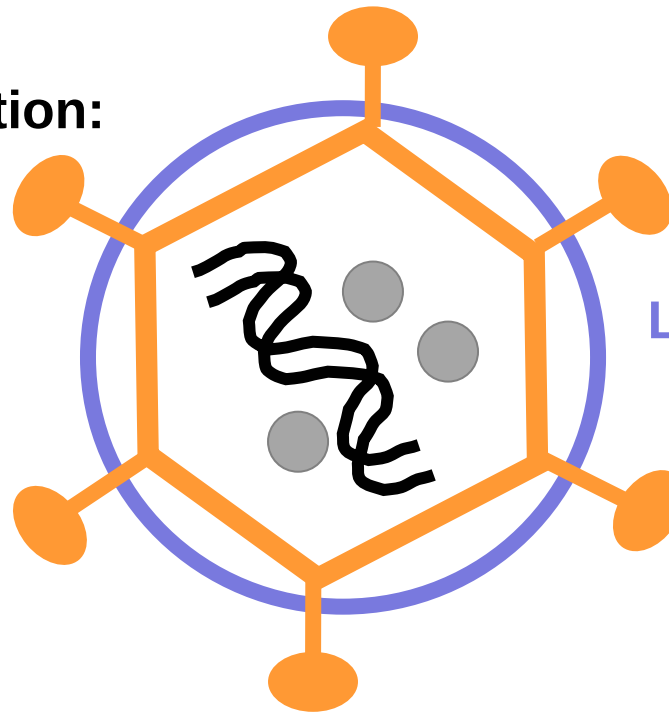


....ein biochemisches Molekül

Was ist ein Virus?

**Genetische Information:
DNA oder RNA**

Proteinkapsid



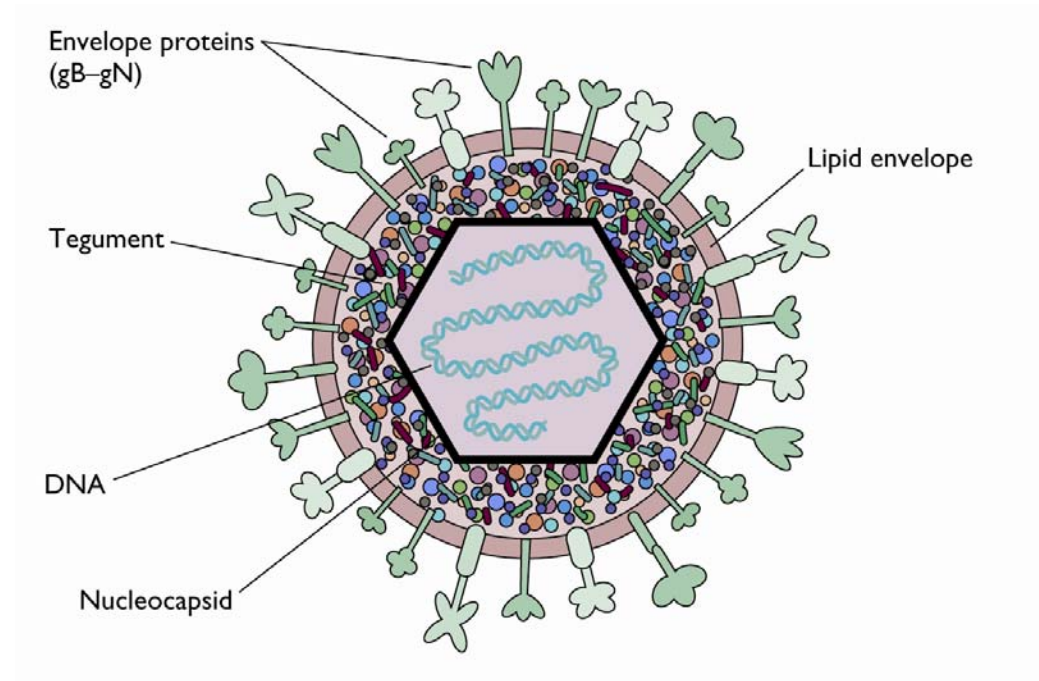
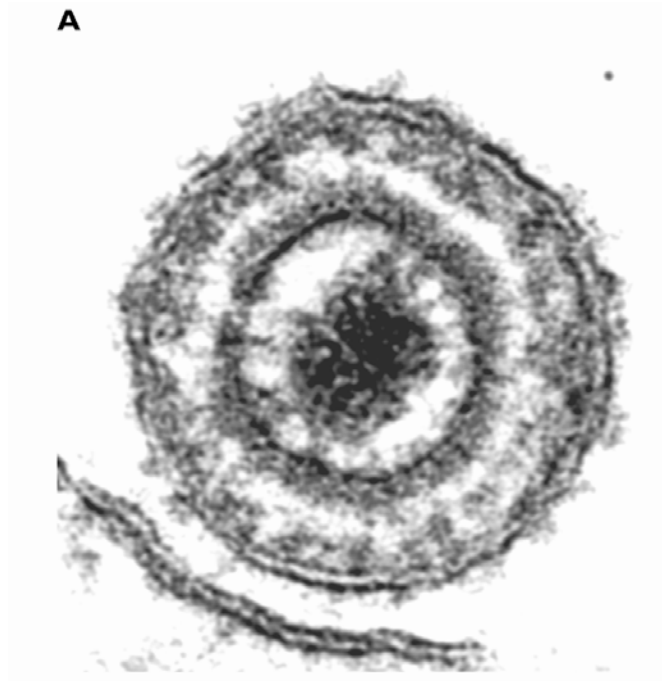
Lipidhülle (envelope)

**(Hilfsproteine,
Enzyme)**

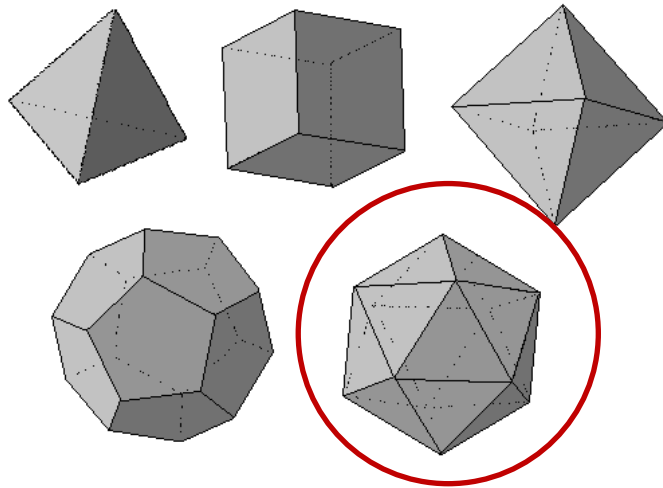
Funktion der äußeren Ummantelung (Kapsid, +/- envelope):

- Umhüllung und Schutz des Genoms
- Anheftung an die Wirtszelle;
- Erkennung spezifischer Wirtszellen

Partikel Aufbau am Beispiel eines Herpes Virus

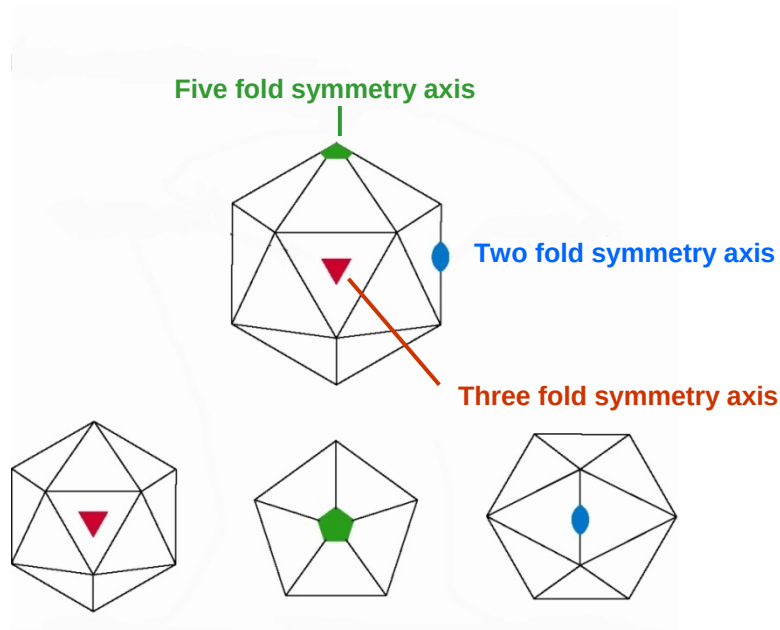


Ikosaedrische Symmetrie



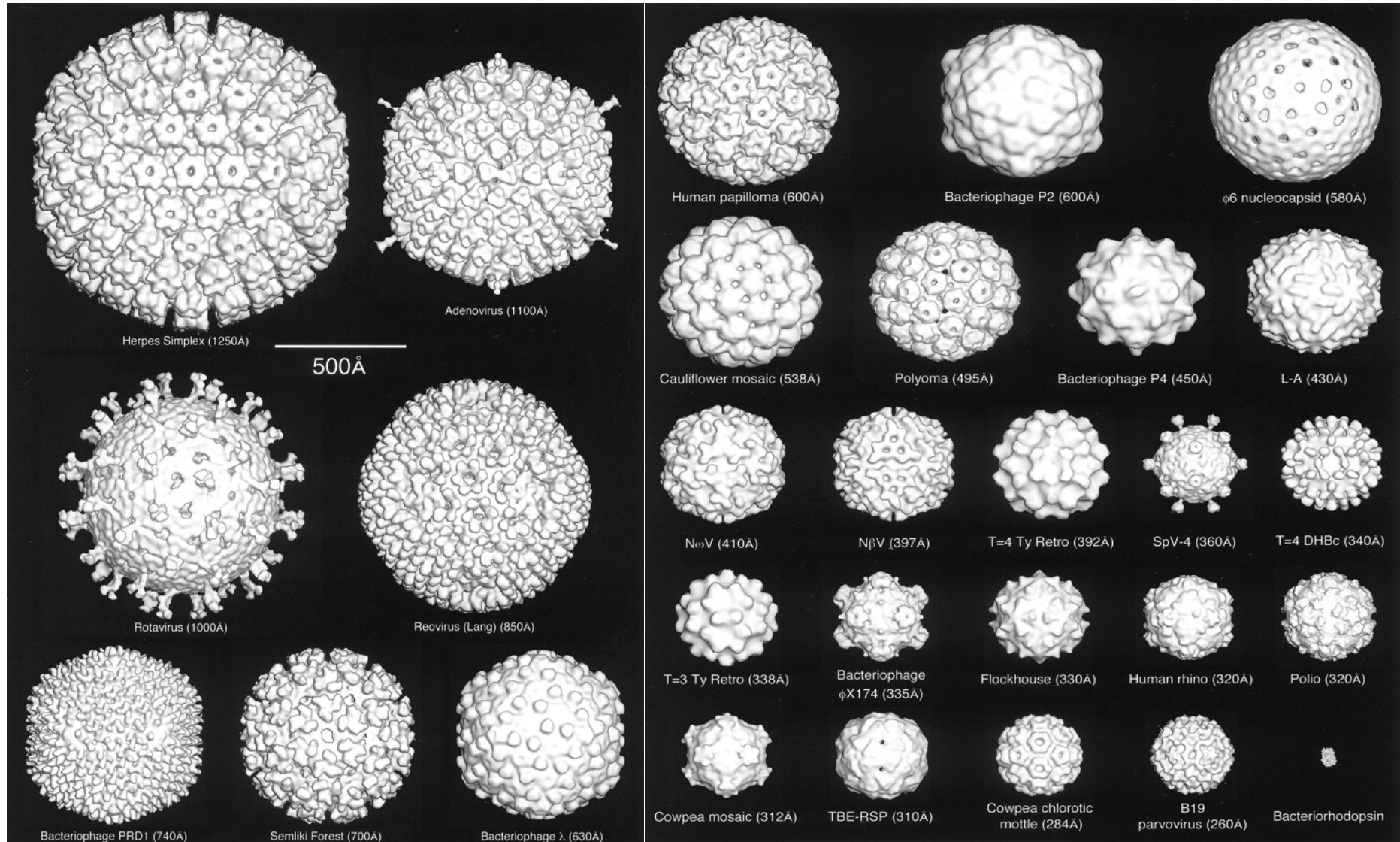
Symmetrische kubische Strukturen:
Platonische Körper

Ikosaeder:
12 Ecken, 20 trianguläre Flächen:
größtest Volumen relativ zur Oberfläche



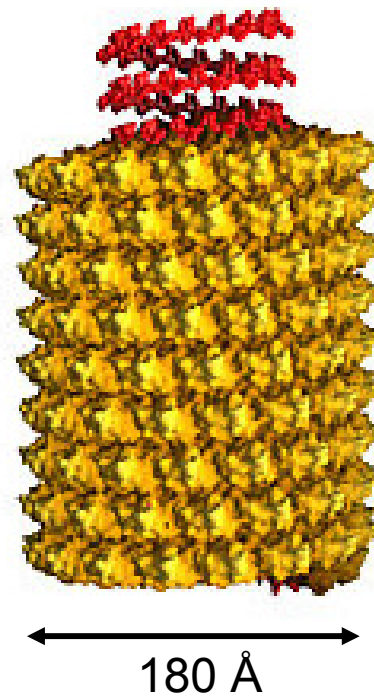
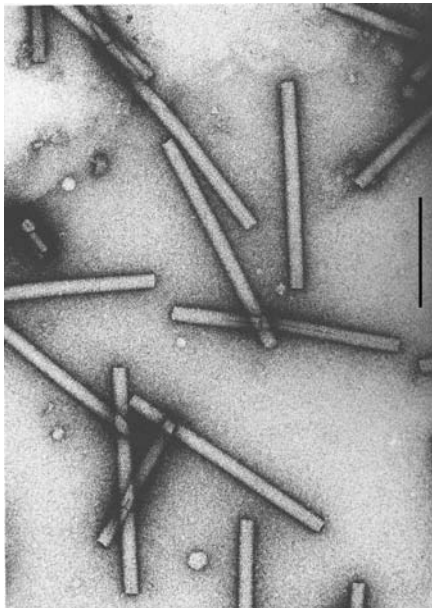
3 Symmetrieachsen

Ikosaedrische Virusstrukturen

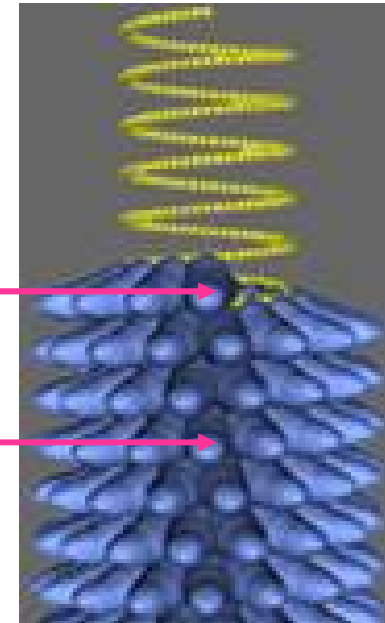


Helikale Virusstrukturen

Tabakmosaikvirus

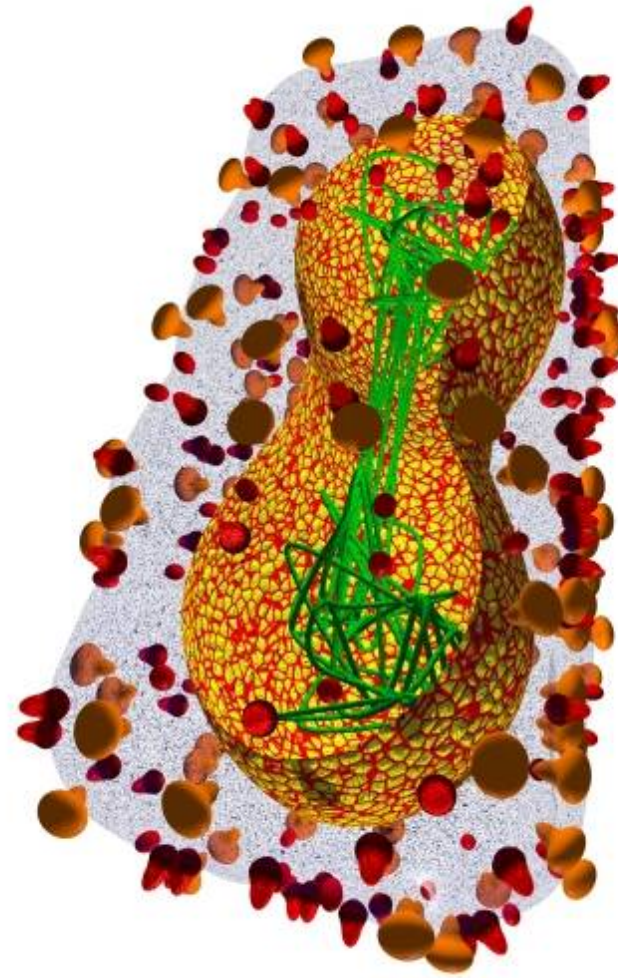
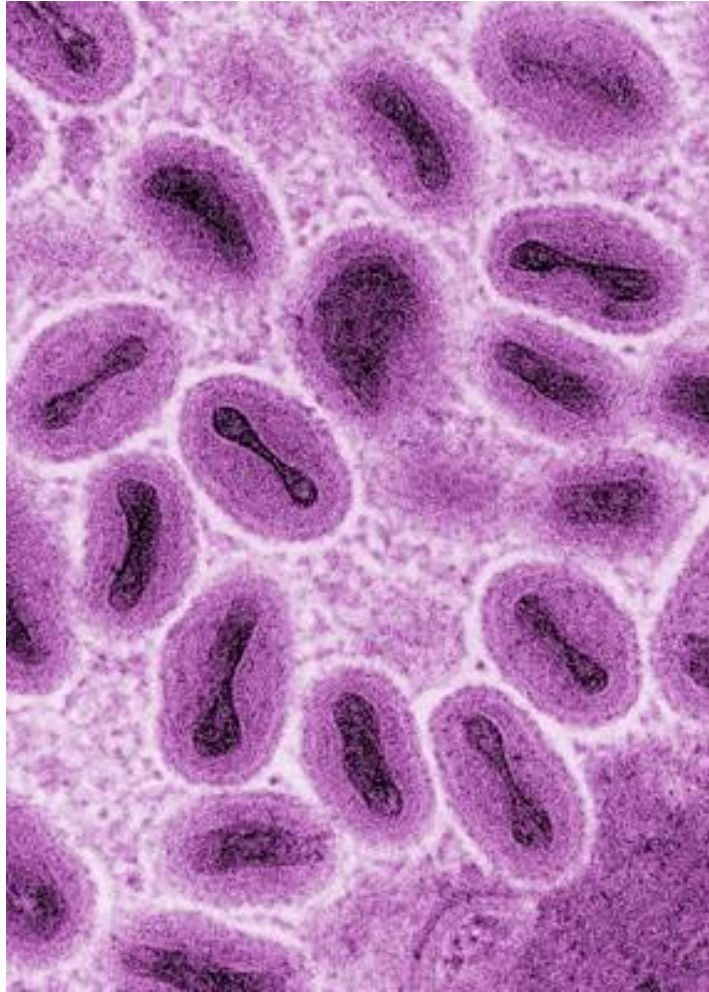


49 UE



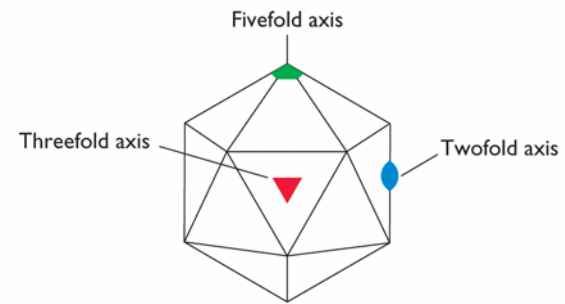
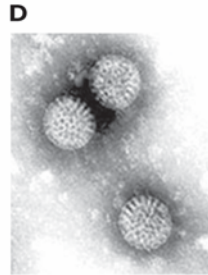
- Länge: 300 nm (3000 Å)
- Durchmesser 18 nm (180 Å)
- Molekulargewicht: 40 MDa
- 2130 Kapsidprotein Monomere (158 AS)
- RNA: 6400 Nukleotide (3 NT/UE)
- 16 $\frac{1}{3}$ UE pro Windung (gleiche Position nach 49 UE)

Komplexe Viren: Pockenvirus

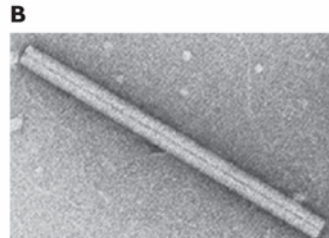


Virus Morphologie

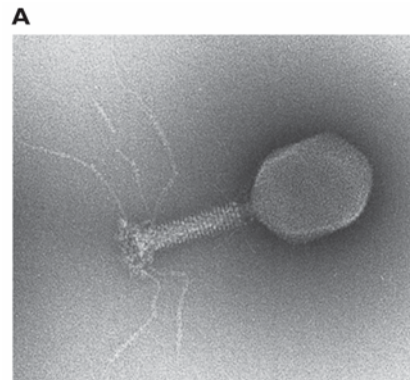
Sphärische Partikel
meistens ikosaedrisch



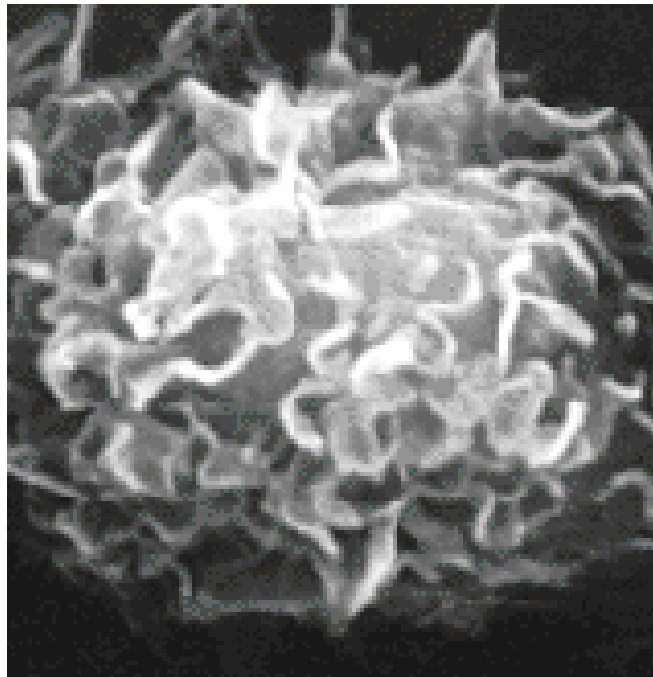
Tubuläre Partikel
meistens helikal



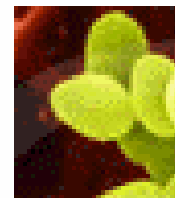
Komplexe Partikel
z. B. Phagen



Grössenvergleich Eukaryonte Zelle – Bakterium - Virus

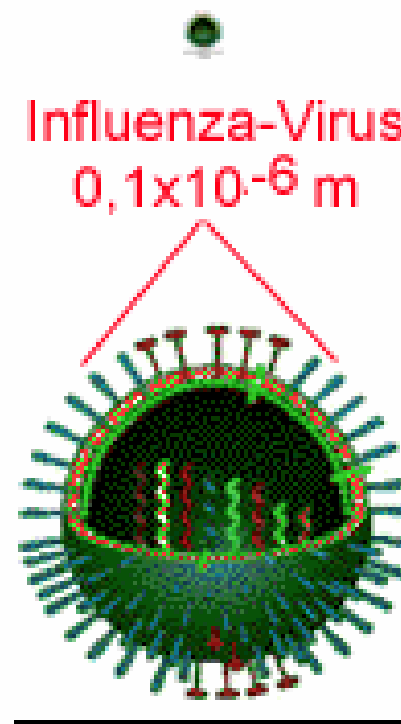


Lymphozyt
 $7 \times 10^{-6} \text{ m}$



Staphylococcus
epidermis
 $0,5 \times 10^{-6} \text{ m}$

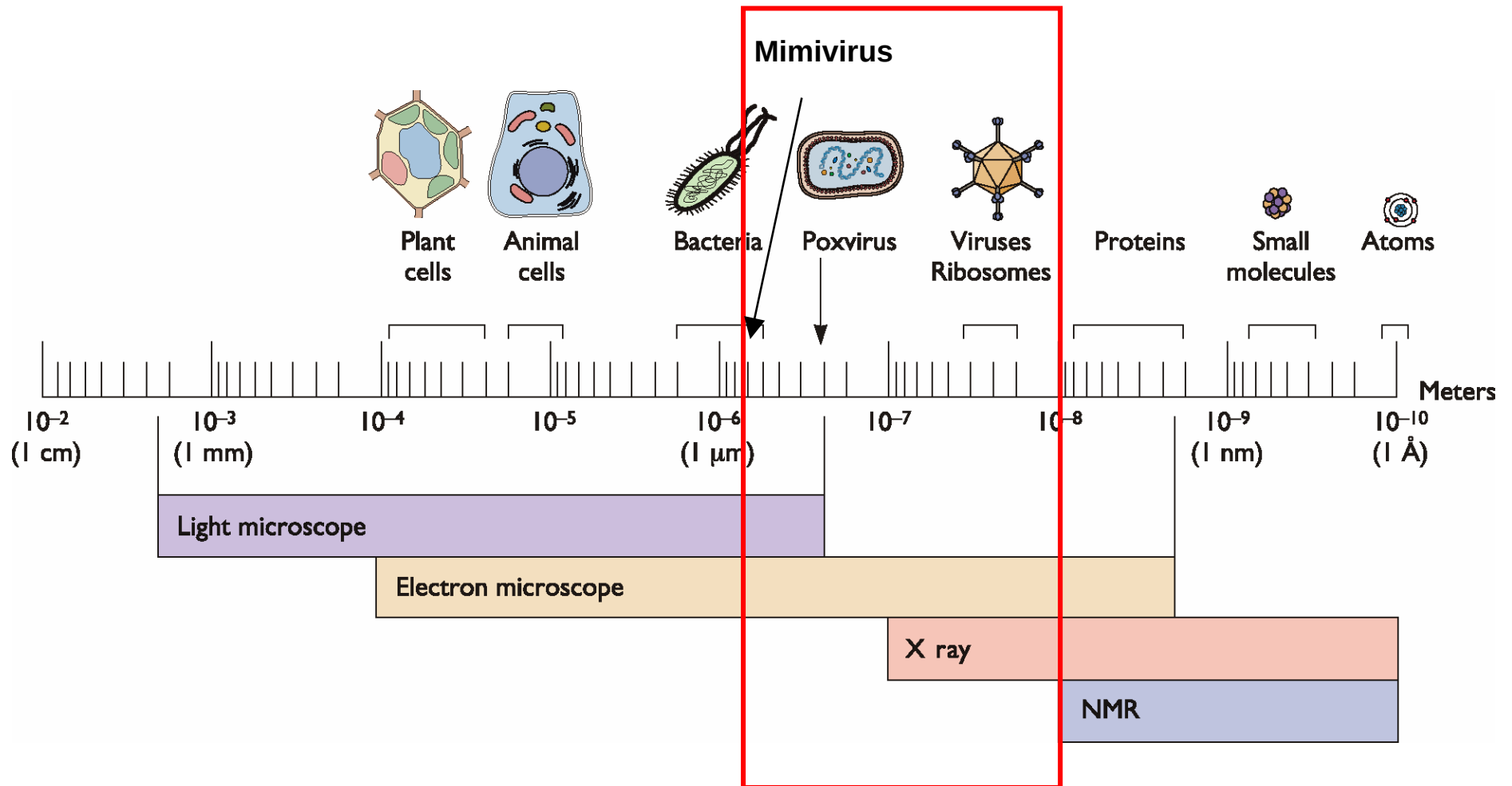
Relativer
Größenvergleich



Influenza-Virus
 $0,1 \times 10^{-6} \text{ m}$

100nm

Physikalische Virusgrösse



Genomgrösse von Viren

Mensch	ca. 20.000 Gene (5×10^9 Bp)
E. Coli	ca. 2.000 Gene (4×10^6 Bp)
Viren	1 – ~900 Gene (ab $\sim 2 \times 10^3$ bis $\sim 1 \times 10^6$)

Grösse viraler Genome

Circoviridae
1,7-2,3 kB ssDNA

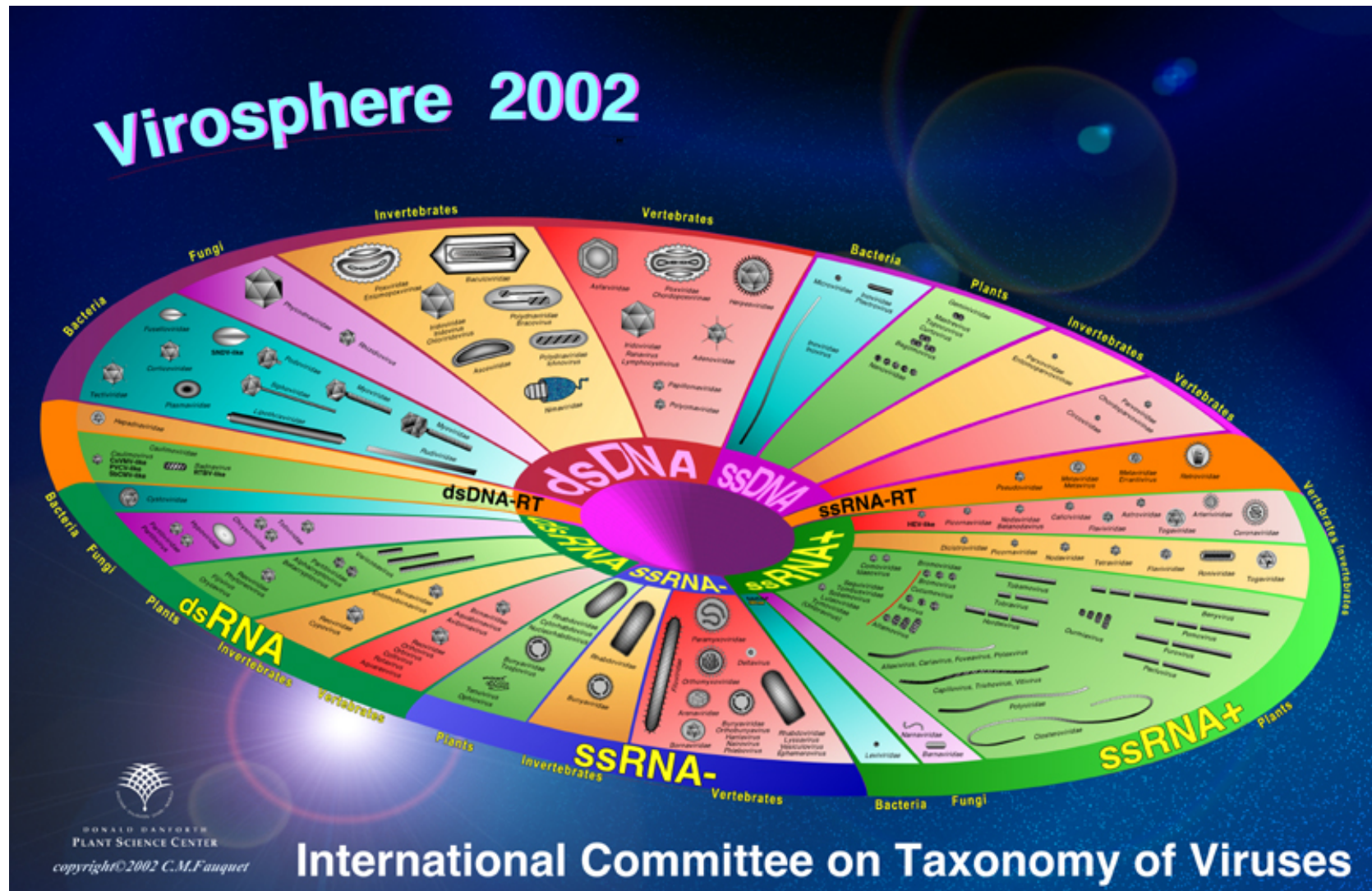


Coronaviridae, **31 kB RNA**
Mimivirus, **800 kB DNA**

Faktoren, die die Genomgrösse begrenzen

- Dauer der Genomreplikation
- Kapsidgrösse
- RNA-Stabilität
- Genauigkeit der viralen Polymerasen

Die ‚Virospäre‘



Klassifikation von Virusgenomen

Genom

DNA-Viren

Einzelstrang

Doppelstrang

RNA-Viren

Plus-Strang (= mRNA)

Minus-Strang

Doppelstrang

**Segmentiertes oder
nicht segmentiertes Genom**

Mit oder ohne Hülle (Envelope)

umhüllt oder nackt

Klassifikation von Animalviren

Umhüllt

Nackt

DNA

Pockenviren

(Vaccinia, Variola, Molluscum contagiosum)

Herpesviren

(HSV, VZV, EBV, CMV, HHV-6, -7, -8)

Hepadna-Viren

(HBV)

Adenoviren

Papovaviren

(Papillom, JCV, BKV)

Parvoviren

(B19, ssDNA)

RNA

Retroviren

(HIV, HTLV)

Orthomyxoviren

(Influenza)

Paramyxoviren

(Masern, Mumps, RSV, Parainfluenza)

Bunyaviren (Hanta)

Togaviren (Röteln)

Flaviviren

(Gelbfieber, FSME, HCV, West-Nil-Virus, Dengue-V.)

Arenaviren

(Lassa)

Rhabdoviren

(Tollwut)

Filoviren

(Ebola, Marburg)

Coronaviren (SARS)

dsRNA

Reoviren

(Rota)

ssRNA

Picornaviren

(Polio, Rhino, Coxackie, HAV, FMDV)

Caliciviren (Noroviren: Norwalk)



Virologische Diagnostik: Was kann ich nachweisen?

Erregernachweis

Virus

- Virusanzucht: infektiöses Agens
- Elektronenmikroskopie: Partikel

Virusbestandteile

Proteine

- Immunfluoreszenz
- Antigen-ELISA (EIA)
- Western-Blot (Immunblot)

Nukleinsäure

- PCR
- RT-PCR

Antikörpernachweis

Immunantwort auf Virusinfektion

Antikörper gegen virale Proteine

- Komplement-Bindungsreaktion
- Hämagglutinations-Hemmtest
- Antikörper-ELISA
- Westernblot
- Immunfluoreszenz
=> IgG, IgM, IgA

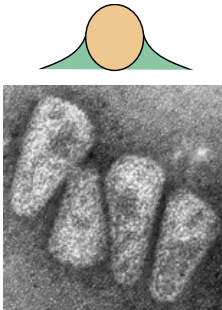
Direkter Virusnachweis

- **Viruspartikel (z.B. Elektronenmikroskopie)**
- **Infektiosität (Versuchstier, Zellkulturen)**
- **Virusbestandteile**
 - ➔ **Proteine (z.B. ELISA)**
 - ➔ **Nukleinsäure (z.B. (RT)-PCR)**

Elektronenmikroskopie

Negative stain

Partikel sind fixiert;
Kontrastierung mit Schwer-
Metallsalzen; einfach, aber
wenige strukturelle Details



Isolierte HIV Kapside

Dünnschnitt

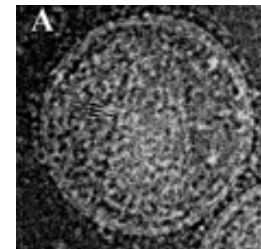
Partikel sind fixiert;
Eingebettet in Plastik
Kontrastierung und
Dünnschnitt
Nur Querschnitt



Reife HIV Partikel

Cryo-EM

Nicht-fixierte (native) Proben und
Partikel ohne Kontrastierung
,vitreous' Eis
wenig Kontrast, aber Überlager-
ung mit 3D Strukturen
Hoch-auflösend



Reife HIV Partikel

Zellkulturen: Essentiell in der Virologie

Immortalisierte Zelllinien

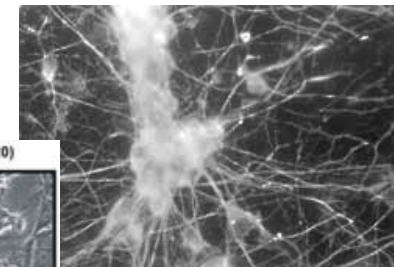
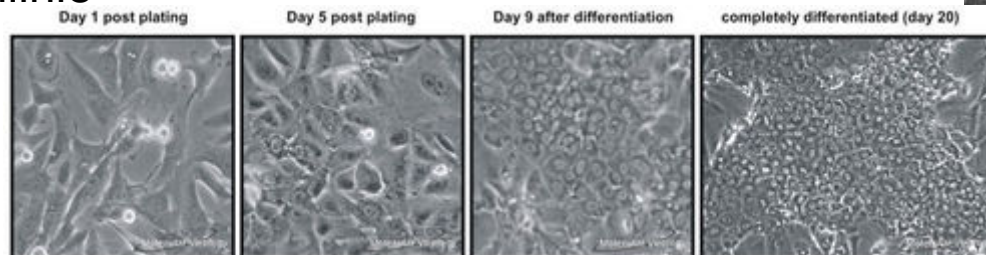


Henrietta Lacks
† 1951
Zervixkarzinom



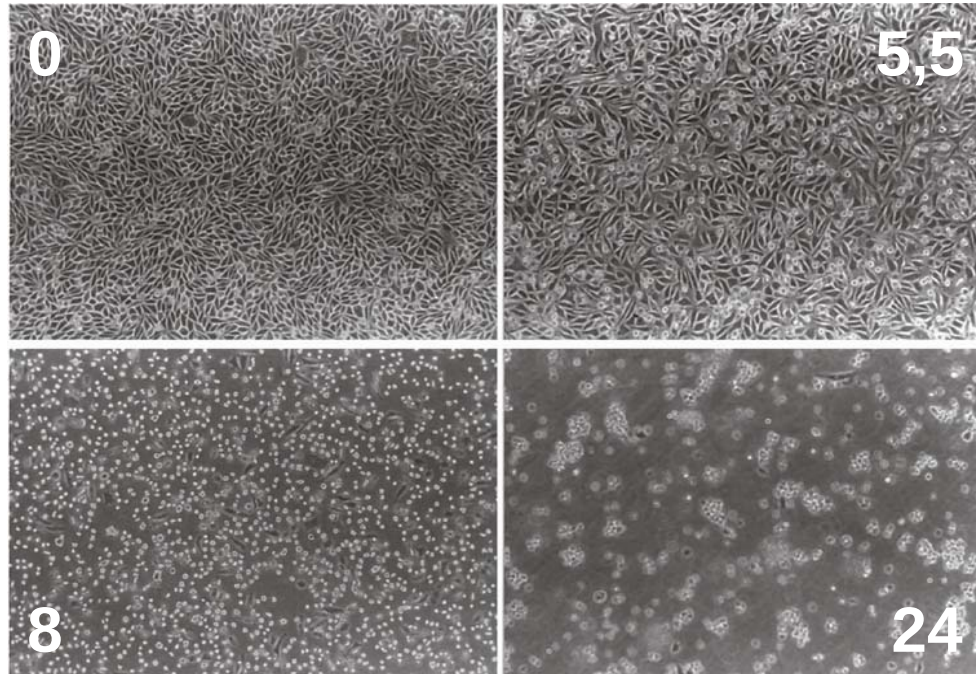
Erste **humane** immortalisierte Zelllinie:
HeLa Zellen

Leberzelllinie



Neuronale Zelllinie

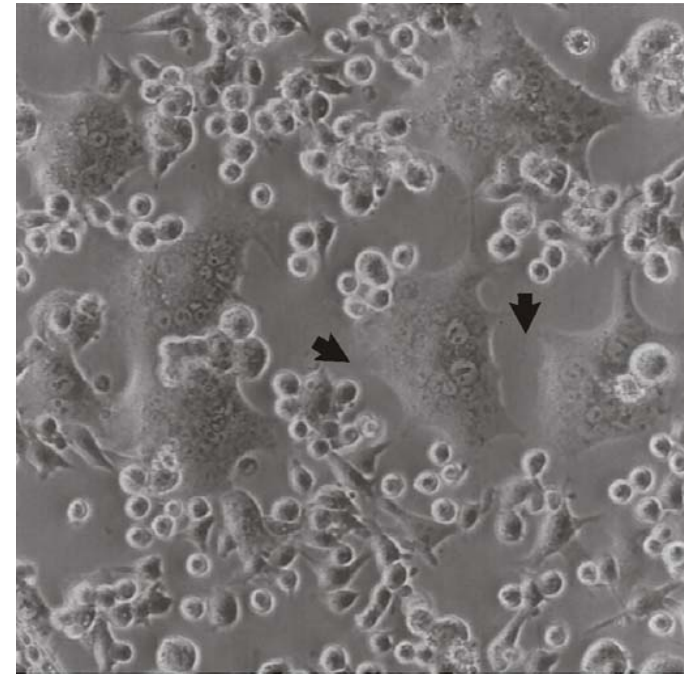
Zytopathogener Effekt von Viren



Infektion von epithelialen HeLa-Zellen mit Poliovirus (Picornavirus)

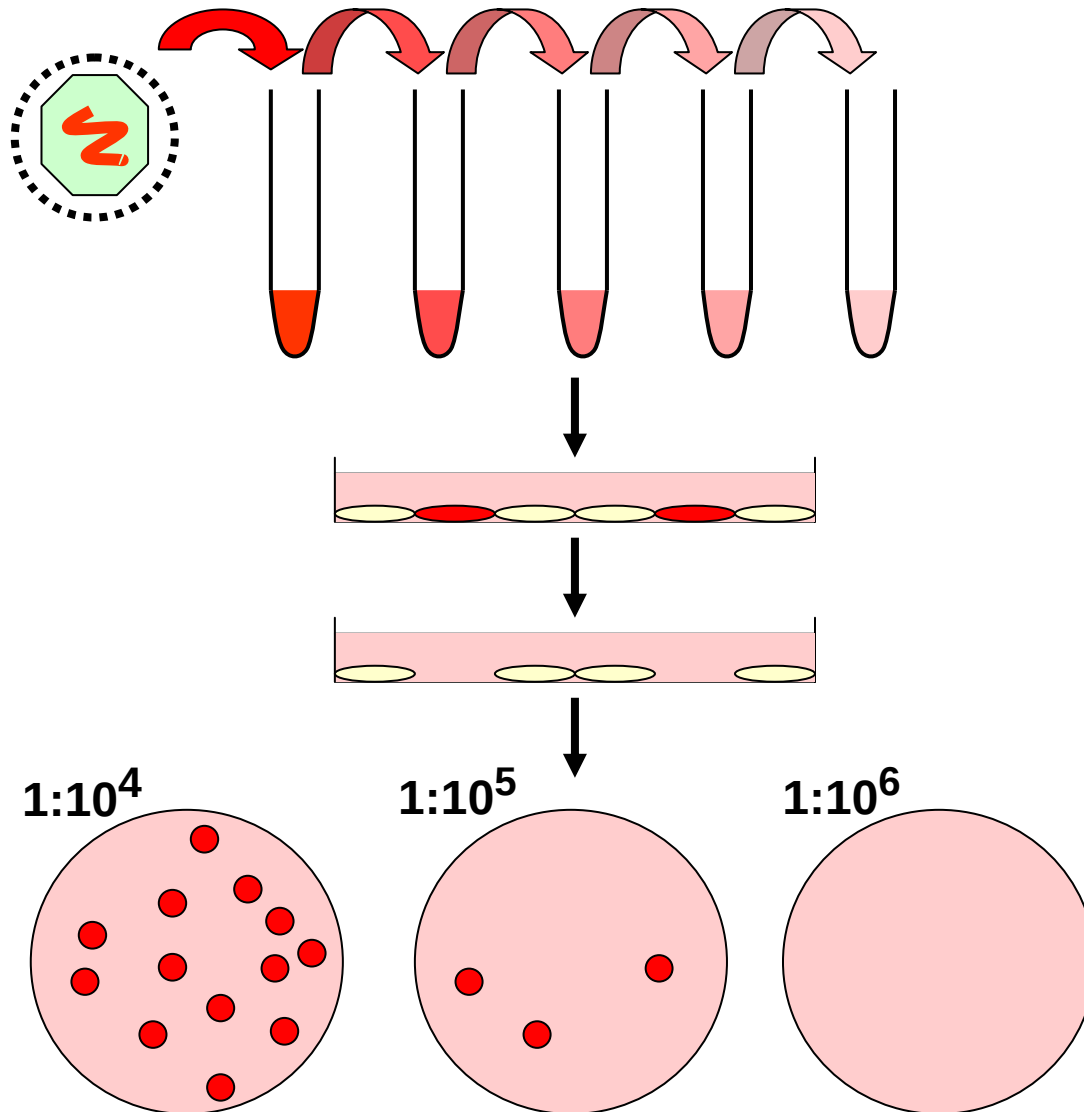
Aufnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion (in Stunden)

fortschreitende **Lyse** der Zellen



Bildung von Riesenzellen (= **Syncytien**) nach retroviraler Infektion

Plaque-Test: Titration von Virusinfektiosität



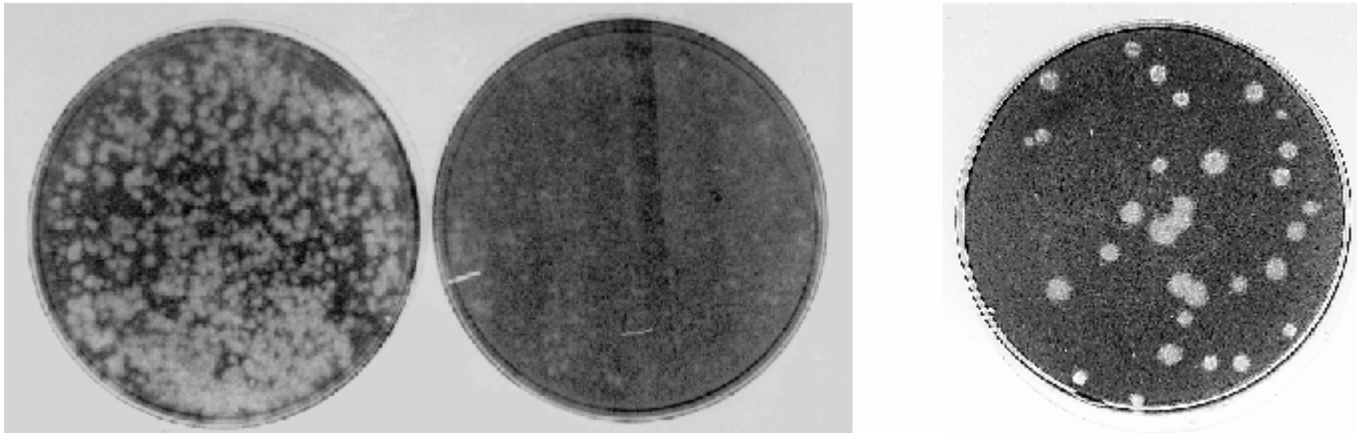
Serielle Verdünnung des Ausgangsmaterials

Ausbringen der Virus-Verdünnungen auf susceptible Zellen

Überschichten mit zähem Methylcellulose-Medium, um die freie Diffusion der Viren zu verhindern.

Kreisförmige „Löcher“ (= Plaques) im Zellrasen durch lokal beschränkte Ausbreitung der Viren und Zellerstörung

Plaque-Test: Titration von Viren

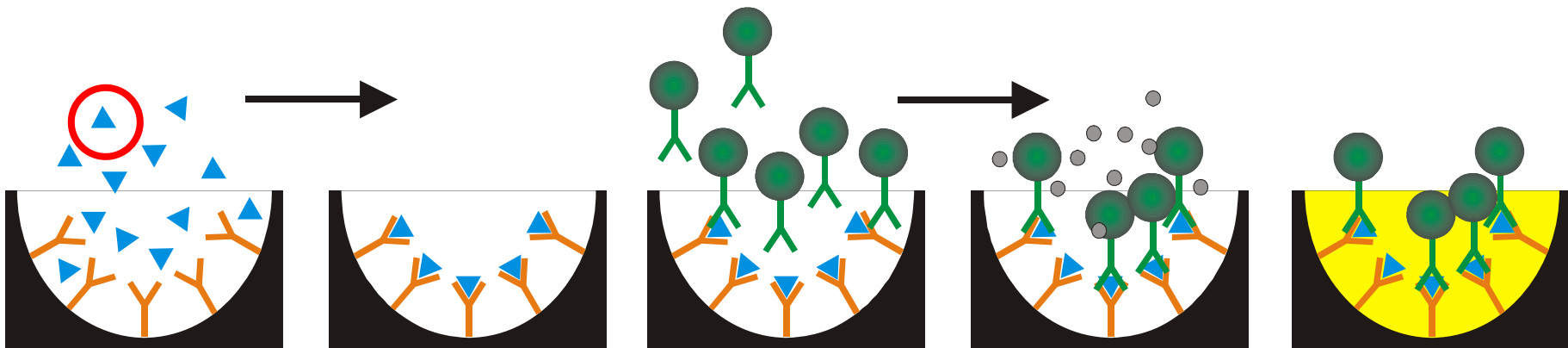
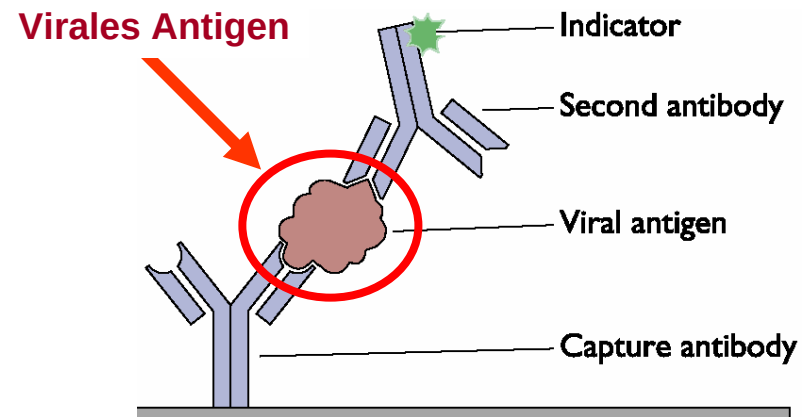


- ➔ Nachweis der Anzahl infektiöser Partikel in einer Lösung
- ➔ Phänotypische Analyse von Virusmutanten (Plaque Morphologie)

Nachweis virale Proteine: ELISA (EIA)

Antigen-ELISA

- Hepatitis B Virus
- HI Virus
- Rotavirus
- Adenovirus
- Astrovirus
- Norovirus



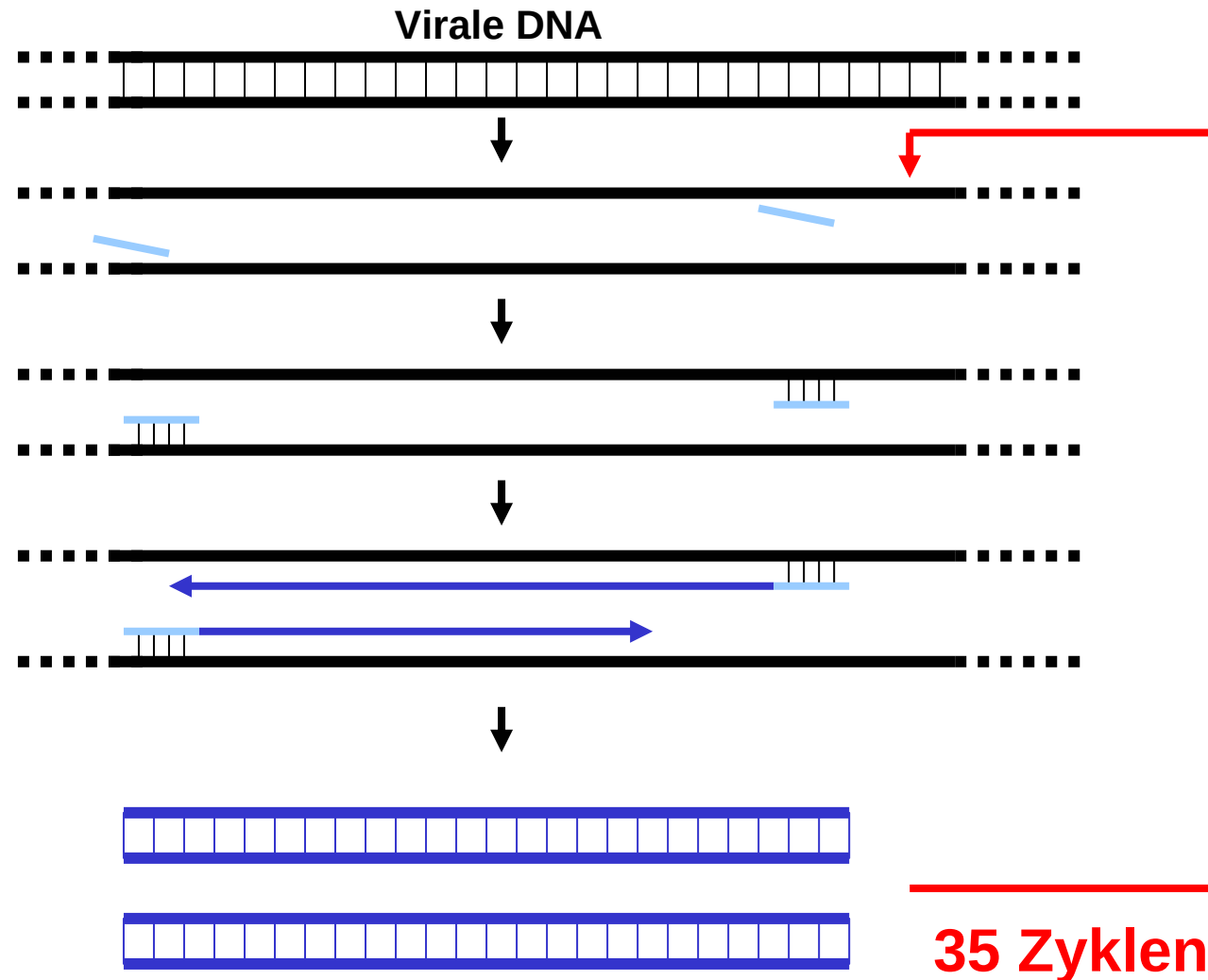
Nachweis viraler Nukleinsäure in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

1. Zyklus

Aufschmelzen der
Stränge durch Erhitzen

Abkühlen in Gegenwart
komplementärer
Oligonukleotid-Primer

Verlängerung der
Stränge durch hitze-
stabile Taq-Polymerase



Nachweis viraler Nukleinsäure in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

1. Zyklus

Aufschmelzen der
Stränge durch Erhitzen

Abkühlen in Gegenwart
komplementärer
Oligonukleotid-Primer

Verlängerung der
Stränge durch hitze-
stabile Taq-Polymerase

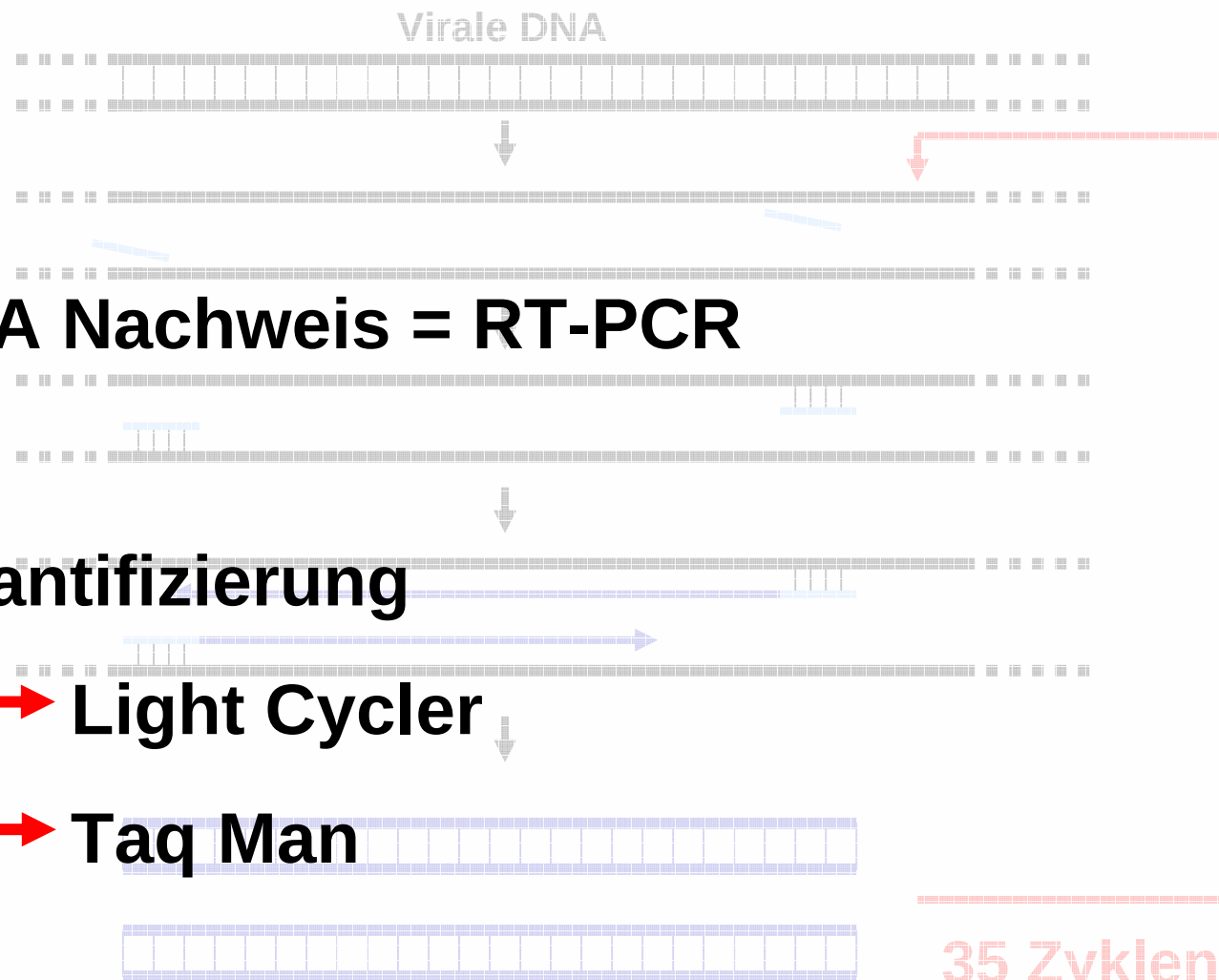
RNA Nachweis = RT-PCR

Quantifizierung

→ **Light Cycler**

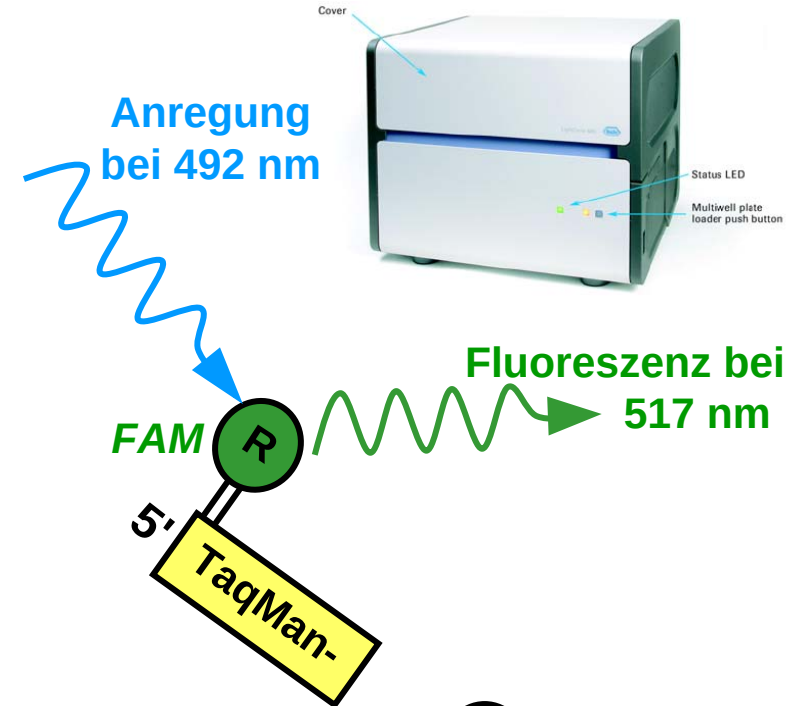
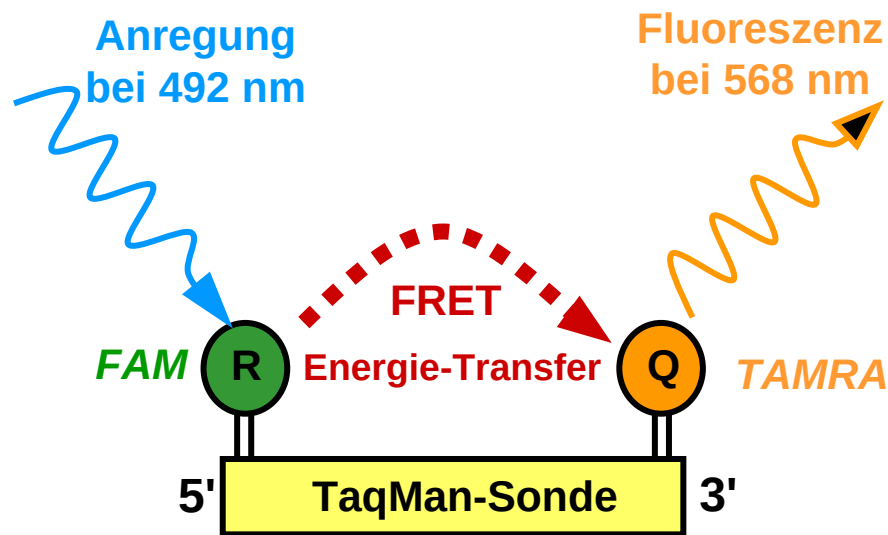
→ **Taq Man**

35 Zyklen

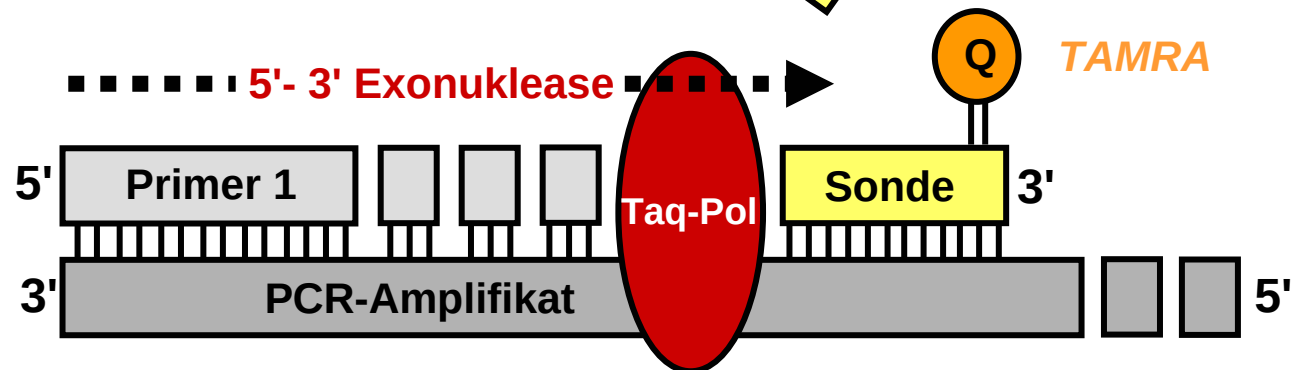


Prinzip der Fluoreszenzdetektion (TaqMan PCR)

spezifischer Nachweis durch Sonden-Hybridisierung (Hydrolyse-Sonde)

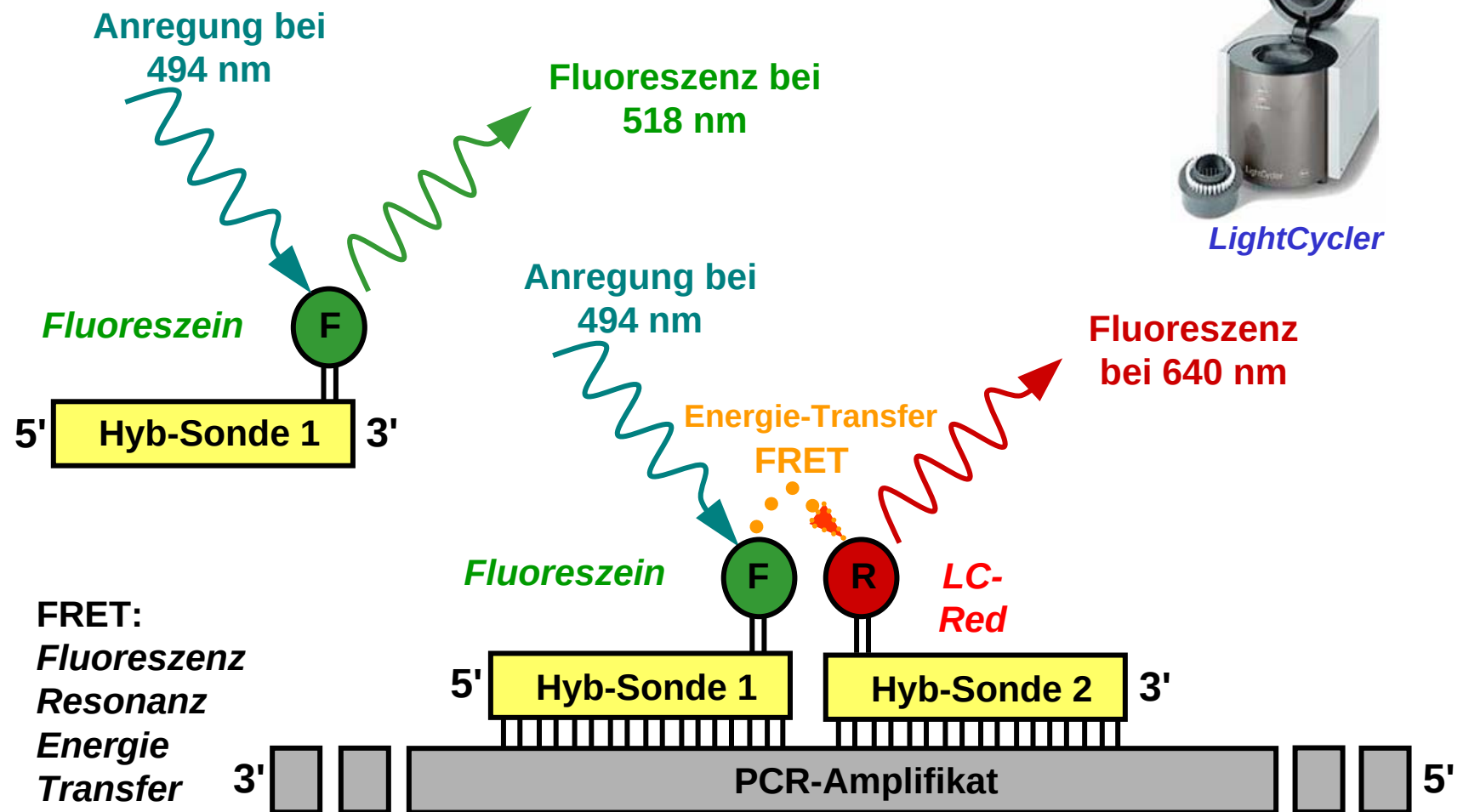


FRET:
Fluoreszenz
Resonanz
Energie
Transfer

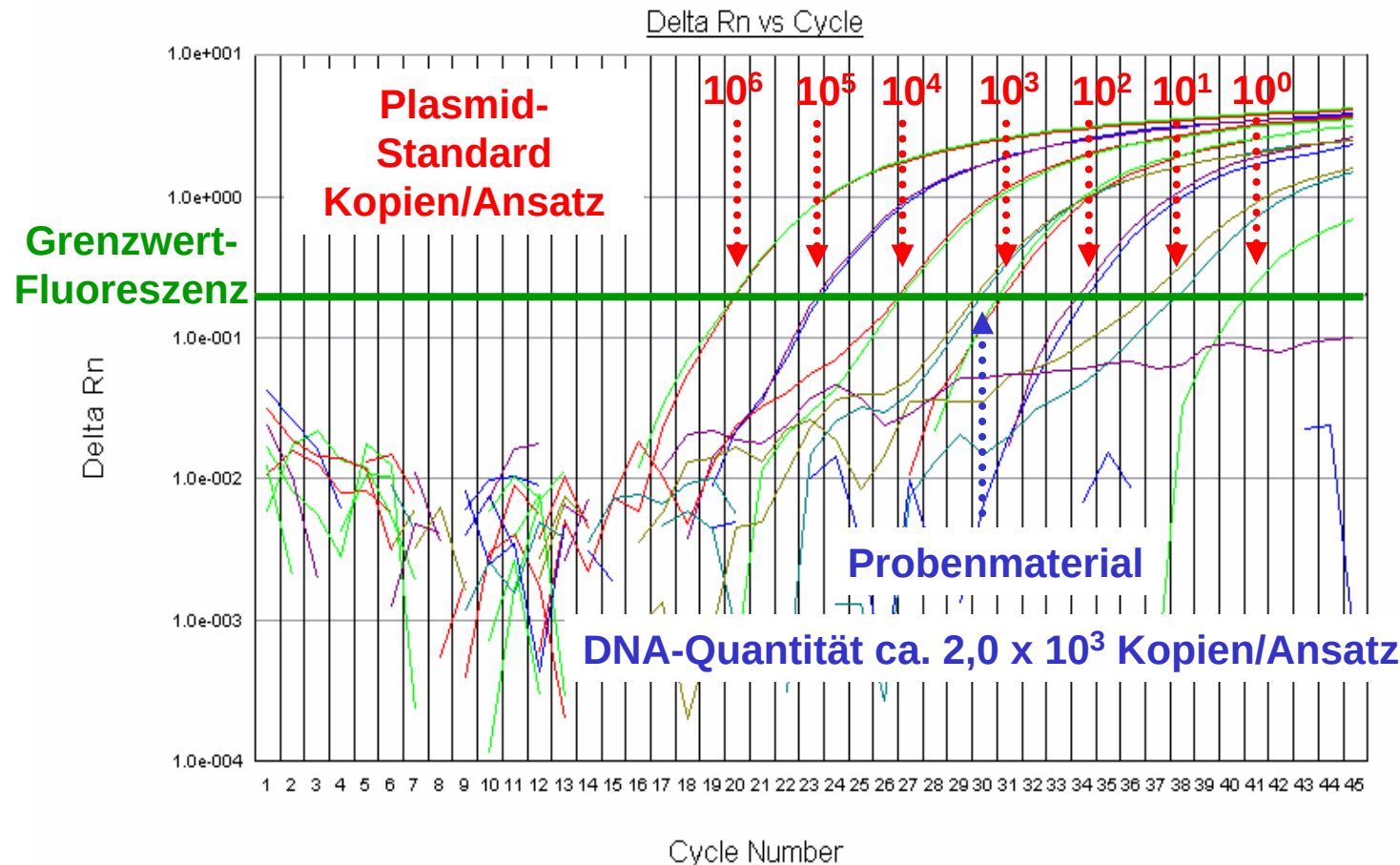


Fluoreszenzdetektion bei der LightCycler PCR

spezifischer Nachweis durch Sonden-Hybridisierung



Quantifizierung der Zielsequenz (real-time PCR)



Selected Detector: HSV 2 Fam; Start: 6; End: 15; Threshold: 0.20000000
Well(s): A3-A4,B3-B4,C3-C4,D3-D4,E3-E4,F3-F4,G3-G4,H3-H6
Document: 1-050504-2.sds (Absolute Quantification)

→ **untere Nachweisgrenze 1 - 10
Kopien/Ansatz**
→ **quantifizierbarer Bereich über 6 - 8 log-
Stufen**

Virologische Diagnostik: Indirekter Virusnachweis (Serologie)

Nachweis virusspezifischer Antikörper

Antikörper-ELISA

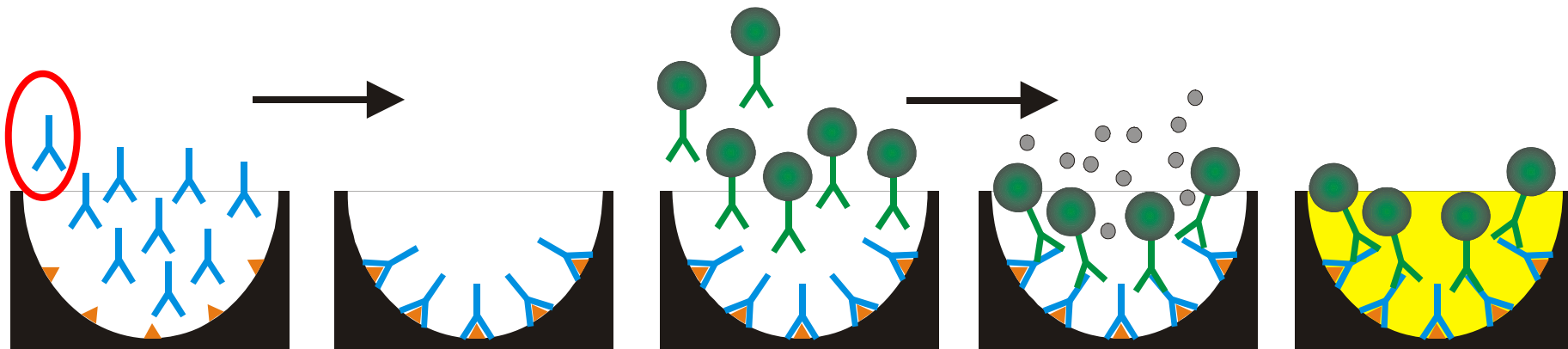
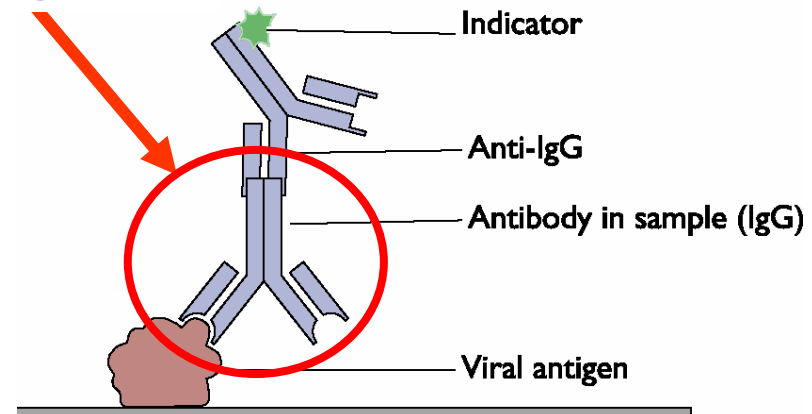
z.B.

HIV-Suchtest

Hepatitis B Virus

Hepatitis C Virus

Antikörper gegen ein
virales Antigen



Arbeiten mit Viren, Virusnachweis

Arbeiten mit Patientenisolaten: L-Stufen

Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen: S-Stufen

Arbeiten in der industriellen Produktion: P-Stufen

Sicherheitsstufen 1 - 4



Biologische Sicherheitsstufen

S1, S2:

z.B. subvirale
Konstrukte

Herpes simplex virus,
HBV, Poliovirus



S4: z.B. Filoviren, hoch-pathogene
Influenzaviren

S3: z.B. HIV, HCV,
DENV



